

症例報告

リンパ球浸潤性胃癌における Epstein-Barr virus (EBV) の分子生物学的検出

病理センター遺伝子診断室；臨床検査技師¹⁾、病理医²⁾

長谷川秀浩¹⁾、片桐 丘充¹⁾、五十嵐俊彦²⁾

癌原性ウイルスとして複数の悪性腫瘍の発生に関与しているとされている Epstein-Barr virus (EBV) は発癌のプロセスが解明されつつあり、将来的に遺伝子治療法の開発が期待される。今回、EBV 再活性化により発生したと推測された胃癌組織より EBV を分子生物学的手法により検出したので報告する。

キーワード：Polymerase chain reaction (PCR)、in situ hybridization (ISH)、Epstein-Barr virus (EBV)、リンパ球浸潤性胃癌、ホルマリン固定パラフィン包埋組織

緒 言

今日の著しい分子生物学的技術の発展に伴い、さまざまな疾患が分子レベルで解明されつつある。その中より、将来に悪性へと進展する可能性のあるものや、疾患の悪性度と関連するもの、抗癌剤の適応性を判断する指標になるものなど、多岐にわたる重要な情報を我々は得ることができる。病理検査の分野においても癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物に対する抗体を用いた免疫組織化学的検索が広く行なわれており、病理診断のみならず臨床へフィードバックできる重要な情報の解析が可能となり、現在では病理検査室には欠かせない手技となっている。しかし、免疫学的検索にも限界があることから、疾患の基本的な原因遺伝子を組織、細胞レベルで検出しようとする試みも病理検査室に導入され、さまざまな検出技術が確立され始めている。1) - 3) γ -ヘルペスウイルスに分類される EBV は、通常小児期に感染し感染 B リンパ球により全身に広がった後、感染症状を起こさない潜伏感染状態で体内に潜伏する普遍的なウイルスとして知られている。しかし、1964 年に Burkitt リンパ腫から始めて分離同定されて以来、伝染性単核症をはじめ悪性リンパ腫、ホジキン病、鼻咽頭癌の発生に関連する事が明らかにされてきた。一方、さまざまな組織学的形態をとる胃癌の中で中分化管状～低分化非スキルス癌の組織型を示し、著しいリンパ浸潤と lacy pattern を構築するタイプの胃癌はリンパ球浸潤性胃癌と呼ばれ、その特徴的な組織所見と共に良好な経過を示す事が知られてきた。近年、このリンパ球浸潤性胃癌は、EBV 感染に関連した胃癌であることが報告され、全体の約 10% 程度を占める事が明らかにされた。4) 5) これまで、病理組織学的に EBV 感染を証明するには固

定条件などを厳密に管理した免疫組織染色による手法以外、病理検査室への検出技術の導入は一般化されていない。今回、我々は組織学的所見から EBV 感染が推測された胃癌摘出材料について分子生物学的解析を行なった結果、EBV 感染陽性と判断された症例を経験したので、再活性化された EBV の検出の意義とその解析方法の有用性について報告する。

症 例

72 才、男性。

現病歴：自覚症状はなかったが、胃集団検診にて異常を指摘され、同月、魚沼病院内科受診。胃内視鏡検査で下部後壁に隆起性病変を認めたため生検。当施設における病理検査の結果、“Group V、低分化型腺癌”と診断され、胃部分切除術が施行された。

病理検査所見

摘出された腫瘍は M, post, p 0 II a + 0 II c, 2.5 cm × 2.5 cm × 1.0 cm, T 1 (sm 2), inf β , intermediate, ly 0, v 0 と診断され、その組織所見は Adenocarcinoma, por 2 > por 1 であり、著しいリンパ浸潤を伴う所見から EBV 感染の可能性が示唆された (図 1, 2)。

方法および結果

ウイルスゲノムの検出

in situ hybridization (ISH) 法

パラフィン包埋された組織を 3 μ m に薄切し、シランコーティングされたスライドガラスにとり乾燥させた。EBV 遺伝子の検出には EBV-m-RNA を標的とし、EBV encoded small RNAs (EBER) を特異的に認識する Peptide nucleic acid (PNA) プローブ (Dako cytotomation) を用いた。薄切後、乾燥した標本は脱パラフィンを行い proteinase K によりタンパク分解処理を施し、m-RNA を露出させた。そこに PNA プローブを滴下し 56℃ にて一時間の hybridization を行なった。その後、FITC 標識されたプローブをアルカリフォスファターゼ標識 FITC 抗体で検出し BCIP/NBT により発色を行なった。鏡検の結果、腫瘍細胞の核に EBV-m-RNA の存在を示す濃紺色の陽性所見が認められた (図 3)。

Polymerase chain reaction (PCR) 法

パラフィン包埋された組織は 10 μ m の厚さに薄切しマイクロチューブに採取した。そこに TaKaRa DEX-PAT を添加し、能書に従い DNA 抽出を行なった。さらに、その抽出液に冷プロパノールと酢酸ナトリウムを添加し DNA を再度、析出、沈降させ冷 70% エタノールにより洗浄をおこない PCR 阻害物質の除去を行なった後、TE 液に溶解させた。EBV DNA の検出には 172 Kbp の二本鎖 DNA の中で、その内側に位置し EBNA 遺伝子の転写プロモーターである EBNA leader protein をコードする領域である Internal repeat 1: IR 1 (BamH 1-W) の一部を特異的に増幅するように Tomita 等 6) により設定されたプライマーの配列を合成し PCR 反応液を調整した。EBV DNA 増幅のため用いたプライマーの塩基配列は図 4 に、PCR の反応液の組成およびサイクルコンディションは図 5 に示す。PCR 増幅後、その反応液を 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、EtBr 染色を施し UV イルミネーターにより観察を行なった結果、EBV の DNA シーケンスから予想された 129 bp の位置にバンドを認めた。(図 6)

したがって、本症例は ISH および PCR の解析結果より、EBV 陽性の胃癌であると判断された。

考 察

近年の分子生物学的手技を用いた癌の研究からさまざまな遺伝子の関連や異常が明らかとなっている。その中には、将来癌へと病変が進展する可能性のあるものや、悪性度と良く相関するもの抗癌剤の適応性を判断する情報を提供してくれるものなどさまざまである。中でも癌原性ウイルスとして知られるヒト乳頭腫ウイルス (HPV) や C 型肝炎ウイルス (HCV)、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) などの感染の有無を確認する事は病変の進展を予測するためには極めて重要な情報である。今回、検出された EBV は複数の発癌のプロセスに関与している事が知られており、胃癌患者においては 10% に感染が認められると報告されており、本邦では年間約 5000 例以上と推測される。したがって、胃粘膜における EBV の再活性化は H. pylori 感染と並んで発癌の危険因子となる可能性がある。EBV 関連胃癌は臨床的には男性に多く、噴門部や胃体部に発生しやすく周囲浸潤傾向の乏しい隆起病変をつくり、他の低分化胃癌と比較すると予後が良好である事が報告されている。7) 8) 通常、EBV 抗原は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の標的となるため EBV 感染細胞は排除されるが、免疫寛容や不全がある場合には CTL の標的になりにくい事から増殖を続け、さらに癌遺伝子である c-myc の転座が加わり癌化にいたることが知られている。さらに、この EBV 再活性化による胃粘膜の癌化では、腫瘍細胞のほとんどに早期の段階から EBV の特異的核内抗原である EBER 陽性シグナルが確認されることが報告されている。9) しかし、EBV の腫瘍原性を考えるうえで、EBV の胃粘膜への感染状態、感染機構、さらに癌化に関与する EBV の遺伝子や、その遺伝子によって産生されたどの蛋白が癌化に重要な役割を担っているかという発癌のプロセスについては明確な解答が得られておらず今後の解明が待たれる。したがって、EBV 再活性化の

証明について、現時点では臨床的意義は乏しいと言わざるをえない。しかし、EBV 感染が原因とされる Duncan 病の原因遺伝子が同定され 10)、さらに、Burkitt リンパ腫では、すでに腫瘍原性と EBV により発現される Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA 1) との関係が明らかとなり、腫瘍化へのプロセスが徐々に解明されている。EBV 感染で発現される蛋白は EBV 関連胃癌と Burkitt リンパ腫は同様に EBNA 1 と EBER のみであることが知られており 11)、これらが仮に同様の癌化へのプロセスをたどるとするならば将来的に EBNA 1 を標的とした特異的遺伝子治療法の開発が期待される。

しかし、検出技術の面からではパラフィン包埋組織から免疫学的手法を用いて EBV 関連抗原である EBNA 1 や Latent membrane protein (LMP) 等の検出は可能ではあるものの活用できる抗体が非常に限られており、EBV の潜伏状態や組織の固定状態によっては検出できない事も多い。また、リンパ球浸潤性胃癌での EBV の検索において早期癌の胃粘膜からは EBV によって産生される LMP 蛋白の過剰発現は見られないと報告 12) されていることから、その検索にあたっては EBER もしくは EBNA 1 を標的にすることが必須とされる。ウイルス感染と発癌の関係がクローズアップされ、これらの微生物を確実に、かつ迅速に同定する技術の確立が迫られている現状において、今回、我々が用いた PNA プローブはアミノ酸誘導体の N-グリシンをモノマーとしてペプチド結合によりオリゴマーを形成する人工産物であることから、生体内に存在しない非常に安定しているプロローブであり、従来 ISH 法に使用されている DNA プローブ、RNA プローブおよびオリゴヌクレオチドプローブに比べ核酸と強い結合を持ち、Tm 値が高い事から目的とする核酸以外との非特異的な結合の可能性は低いとともに極めて短時間で標的とする核酸との間にハイブリットを形成するという特徴がある。13) また、病原遺伝子の核酸をポリメラーゼ反応により増幅させ検索する PCR 法は、病理組織標本より抽出された DNA を検出材料とした場合には不向きとされていたが標本製作過程における固定液やプライマーの選定など各種条件に配慮しながら、その検出条件が確立されはじめており 1) - 2)、今後の適応項目の拡大が望まれる。今回、我々が用いた解析法は病理組織からのウイルスの遺伝子レベルの検索方法として病理診断に有用な手技となることが期待される。

文 献

1. 長谷川秀浩、五十嵐俊彦. Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法による子宮頸癌関連 Human papillomavirus (HPV) の同定. 新潟県厚生連医誌, 2004; 13(1): 25-29.
2. 長谷川秀浩、片桐丘充、五十嵐俊彦. Polymerase chain reaction (PCR) 法による病理組織からの Cytomegalovirus (CMV) DNA の検出. 新潟県厚生連医誌 2003; 12(1): 6-8.
3. 長谷川秀浩、五十嵐俊彦. Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による染色体異質的シグナルの検出—ホルマリン固定パラフィン包埋組織への応用

- －. 新潟県厚生連医誌 2004 ; 13(1) : 30－33.
4. Min K W, Holmquist S, Peiper S, O' Leavy T. Poorly differentiated adenocarcinoma with lymphoid stroma (Lymphoepithelioma-like carcinoma) of stomach : Report of three cases with Epstein-Barr virus genome demonstrated by the polymerase chain reaction. *Am J Clin pathol.* 1991 ; 96 : 219－227.
5. Pittaluga S, Loke S L, So K C et al. Clonal Epstein - Barr virus in lympho- epithelioma - like carcinoma of the stomach : demonstration of viral genome by in situ hybridization and southern blot analysis. *Mod Pathol.* 1992 ; 5 : 661－664.
6. Tomita Y, Ohsawa M, Mishiro Y, et al. The presence and subtype of Epstein-Barr virus in B and T cell lymphomas of the sino-nasal region from the Osaka and Okinawa districts of Japan. *Lab invest* 1995 ; 73 : 190－196.
7. Shibata D, Weiss L W. Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 1993 ; 143 : 1250－1254.
8. Watanabe H, Enjouji M et al. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Cancer* 1979 ; 38 : 232－243.
9. 深山正久 : Epstein-Barr ウィルス関連胃癌. *病理と臨床* 1995 ; 13(8) : 1175－1183.
10. Sayos J, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998 ; 395 : 462－469.
11. Rowe M, et al. Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA 1 positive latency in B lymphocytes. *J Virol.* 1992 ; 66 : 122－131.
12. Imai S, Koizumi S, Sugiura M et al. Gastric carcinoma : monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ; 91 : 9131－9135.
13. Demidov V, Yavnilovich M V, Beloserkovskii B P. et al. Kinetics and mechanism of polyamide(“peptide”) nucleic acid binding to duplex DNA, *Proc. Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 2637－2641.

Sci. USA 1995 ; 92 : 2637－2641.

Case report

Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA and RNA from gastric carcinoma with lymphoid stroma by genetic analysis.

Department of genetic diagnosis room, Pathology center ; Medical technologist ¹⁾, Pathologist ²⁾

Hidehiro Hasegawa ¹⁾, Takemitsu Katagiri ¹⁾, Toshihiko Ikarashi ²⁾

Background and Case : Infection of Epstein-Barr virus (EBV) is the causes of many disease. EBV infection was suggested histologically from the evidence poorly differentiated adenocarcinoma with lymphoid stroma of gastric carcinoma. We detected EBV RNA and DNA in paraffin embedded tissue by genetic analysis. The detection technique consisted of in situ hybridization (ISH) and polymerase chain reaction (PCR) methods. We detected both EBV encoded small RNA (EBER) by ISH method with peptide nucleic acid probe and EBV encoded nuclear antigen leader protein by PCR method in this case. Our gastric carcinoma was the infection of EBV.

Conclusion : These techniques appear to be useful in the indentification of EBV from routine pathological tissue in terms of both sensitivity and specificity.

Keyword : Epstein-Barr virus (EBV), Polymerase chain reaction (PCR), in situ hybridization (ISH), Gastric carcinoma with maked lymphoid infiltrate, Formalin-fixed paraffin embedded tissue.

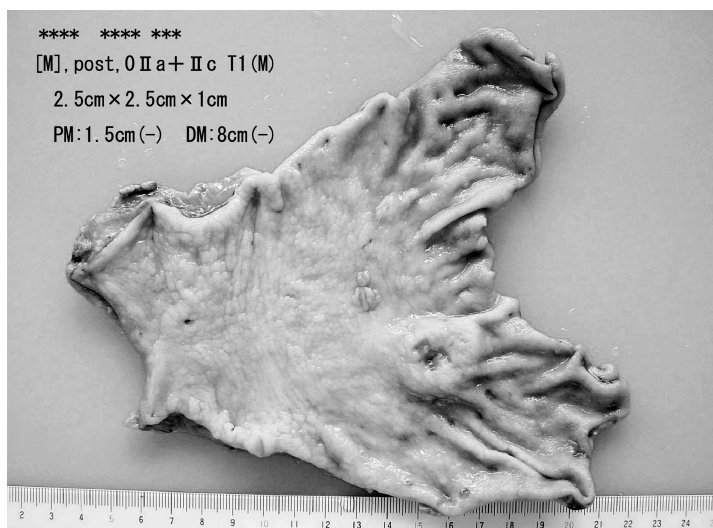


図1 摘出された胃の肉眼所見

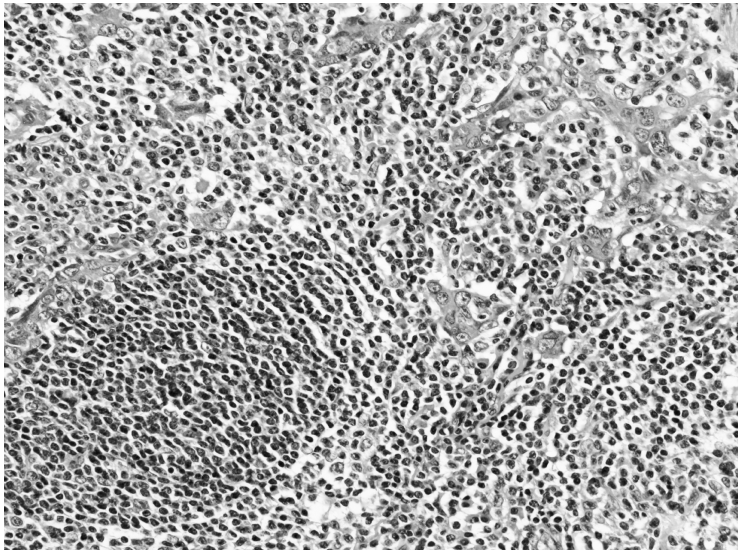


図 2 組織所見 (HE 染色像)

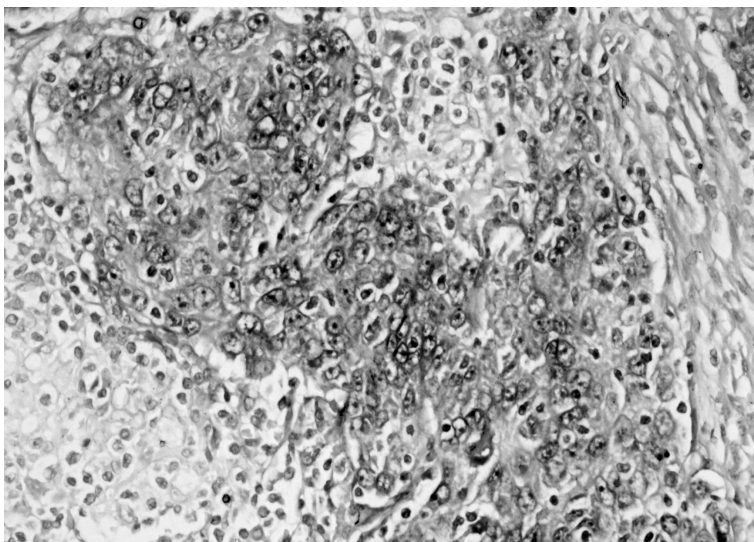


図 3 In situ hybridization 法による EBV m-RNA の検出

Forward: 5'- CCA GAC AGC AGC CAA TTG TC .-3'

Reverse: 5'- GGT AGA AGA CCC CCT CTT AC .-3'

増幅長: 129bp

図4 EBV DNA 増幅に使用したプライマーの塩基配列

PCR-reaction medium	20 μ l/sample	PCR condition			
d-H ₂ O	14 μ l	hot start	94°C	3'	1 cycle
× 10 PCR buffer with MgCl ₂	2 μ l	denaturation	94°C	1'	
2mM d-NTP	2 μ l	annealing	58°C	1'	34 cycles
50pM primer (F)	0.5 μ l	extention	72°C	1'	
50pM primer (R')	0.5 μ l	last extention	72°C	3'	1 cycle
Ampli Taq Gold	0.2 μ l	hold	4°C		
sample	1 μ l				

図5 PCR 反応液の組成と PCR サイクルコンディション

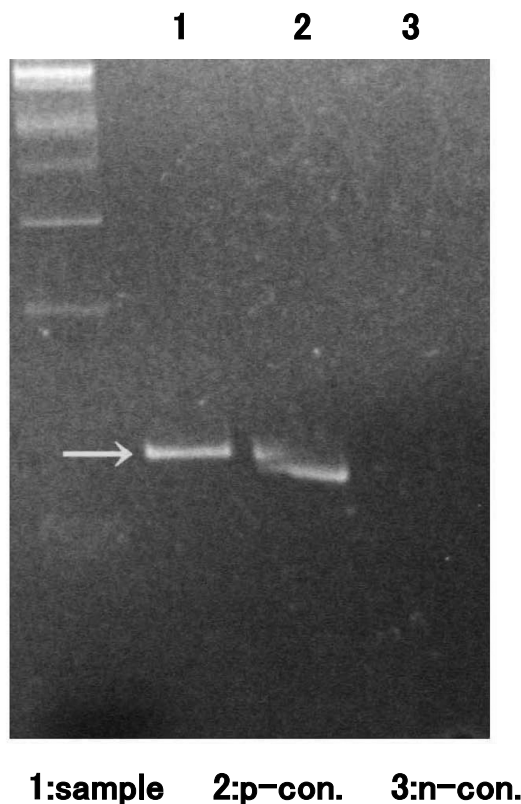


図6 PCR 法による EBV DNA の検出結果